

22-95B

File 351:Derwent WPI 1963-2000/UD,UM &UP=200107

(c) 2001 Derwent Info Ltd

\*File 351: Price changes as of 1/1/01. Please see HELP RATES 351.

72 Updates in 2001. Please see HELP NEWS 351 for details.

File 351:Derwent WPI 1963-2000/UD,UM &UP=200107

(c) 2001 Derwent Info Ltd

1/29/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008479310

WPI Acc No: 1990-366310/199049

XRAM Acc No: C90-159470

XRPX Acc No: N90-279293

Vegetable tissue culture method - comprises treating vegetable tissue with aq. soln. contg. auxin and incubating on culture medium

Patent Assignee: SUMITOMO CHEM IND KK (SUMO )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
-----------	------	------	-------------	------	------	------

JP02265473	A	19901030	89JP-0085061	A	19890403	199049 B
------------	---	----------	--------------	---	----------	----------

JP-2936578	B2	19990823	89JP-0085061	A	19890403	199939
------------	----	----------	--------------	---	----------	--------

Priority Applications (No Type Date): 89JP-0085061 A 19890403

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

JP02265473	A		5		
------------	---	--	---	--	--

JP-2936578	B2	6	C12N-005/04	Previous Publ. patent JP-2265473	
------------	----	---	-------------	----------------------------------	--

Abstract (Basic): JP 2265473 A

Method for tissue culture of vegetable, which comprises treating tissue of vegetable with aq. soln. contg. auxin and then incubating the treated tissue on a culture medium for tissue culture.

In the aq. soln., natural or synthetic cytokinin as well as natural or synthetic auxin may be presented. The auxin includes IAA, 2,4-D, IBA, NAA, MCPA, 2,4,5-T, 2,3,6-TB, 2,4-DB, MCPB, etc. The cytokinin includes BA, CPPU, benzyl adenine, etc. The auxin is used in 0.1 to 100 mg/litre, more pref. 0.5 to 50 mg/litre. When both auxin and cytokinin are used, the both are used 0.1 to 100 mg/litre, pref. 0.5 to 50 mg/litre, respectively. The tissue is immersed in the aq. soln. for 1 hour to 3 days, pref. for 6 hours to 2 days.

USE/ADVANTAGE - By the method, formation of callus and body of vegetable at high yield can be attained.

Dwg.0/0

Title Terms: VEGETABLE; TISSUE; CULTURE; METHOD; COMPRISE; TREAT; VEGETABLE

; TISSUE; AQUEOUS; SOLUTION; CONTAIN; AUXIN; INCUBATE; CULTURE; MEDIUM

Derwent Class: C03; D16; P13

International Patent Class (Main): C12N-005/04

International Patent Class (Additional): A01H-004/00; A23L-001/27; C09B-061/00

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): C04-A07D; C11-A; D05-H01; D05-H08

Chemical Fragment Codes (M1):

\*10\* M720 M903 N136 Q233 V400 V406 V754

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* D011 D601 J0 J011 J1 J171 M280 M311 M321 M342 M372 M391 M412 M430 M511 M520 M530 M540 M782 M903 M904 M910 N136 P134 Q233 R023 R00536-M

\*02\* G015 G100 H5 H541 H6 H602 H608 H642 H8 J0 J011 J1 J171 M280 M311 M321 M342 M349 M381 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 N136 P134 Q233 R023 R00613-M

\*03\* D011 D601 J0 J011 J1 J171 M280 M313 M321 M332 M342 M372 M391 M412 M430 M511 M520 M530 M540 M782 M903 M904 M910 N136 P134 Q233 R023 R01104-M

\*04\* G020 G221 J0 J011 J1 J171 M280 M311 M321 M342 M372 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 N136 P134 Q233 R023 R00530-M

\*05\* G015 G100 H5 H541 H6 H602 H641 H8 J0 J011 J1 J171 M210 M211 M240 M281 M311 M321 M342 M349 M381 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 N136 P134 Q233 R023 R00612-M

\*06\* G017 G100 H5 H541 H6 H602 H609 H643 H8 J0 J011 J1 J171 M280 M311 M321 M342 M349 M381 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 N136 P134 Q233 R023 R00602-M

\*07\* G015 G017 G100 H541 H6 H602 H608 H609 H641 H642 H643 J0 J011 J1 J131 J171 M210 M211 M240 M280 M281 M282 M313 M320 M321 M332 M342 M349 M381 M391 M414 M430 M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 N136 P134 Q233 R023 R03088-M R08851-M R13767-M

\*08\* D011 D931 G010 G100 H1 H100 H121 L943 M280 M311 M321 M342 M373 M391 M412 M430 M511 M520 M531 M540 M782 M903 M904 N136 P134 Q233 R023 R03410-M

\*09\* H5 H581 H7 H721 H725 H8 J0 J013 J1 J173 M210 M211 M272 M281 M316 M321 M333 M344 M381 M391 M416 M430 M782 M800 M903 M904 N136 P134 Q233 R023 V0 V020 R20705-M

Derwent Registry Numbers: 0530-U; 0536-U; 0602-U; 0612-U; 0613-U; 1104-U

Specific Compound Numbers: R00536-M; R00613-M; R01104-M; R00530-M; R00612-M; R00602-M; R03088-M; R08851-M; R13767-M; R03410-M; R20705-M

## ⑫ 公開特許公報(A)

平2-265473

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)10月30日

C 12 N 5/04  
A 01 H 4/008502-2B  
8515-4B

C 12 N 5/00

F

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑭ 発明の名称 組織培養方法

⑰ 特 願 平1-85061

⑱ 出 願 平1(1989)4月3日

⑲ 発 明 者 山 本 俊 哉 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内  
 ⑲ 発 明 者 坂 野 弘 親 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内  
 ⑲ 発 明 者 西 川 晶 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内  
 ⑲ 発 明 者 広 原 日出男 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社内  
 ⑲ 出 願 人 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号  
 ⑲ 代 理 人 弁理士 諸石 光 薫 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

組織培養方法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) 植物の組織培養において、植物組織を組織培養用培地に植え付ける前に、該植物組織を天然または合成オーキシンを含む水溶液で処理することを特徴とする植物の組織培養方法。
- (2) 植物の組織培養において、植物組織を組織培養用培地に植え付ける前に、該植物組織を天然または合成オーキシンと天然または合成サイトカイニンとを含む水溶液で処理することを特徴とする植物の組織培養方法。
- (3) 植物の組織培養において、植物組織を組織培養用培地に植え付ける前に、該植物組織を天然もしくは合成オーキシンを含む水溶液または天然もしくは合成オーキシンと天然もしくは合成サイトカイニンとを含む水溶液で処理した後、組織培養用培地に植え付け、培養してカルスを形成させ、得られたカルスをさ

らに同一の培地で培養を続けて植物体の再分化を行うことを特徴とする植物の組織培養方法。

## 3. 発明の詳細な説明

## &lt;産業上の利用分野&gt;

本発明は、植物の組織培養方法に関するものである。

## &lt;従来の技術&gt;

近年、組織培養を利用した植物育種がさかんになってきている。

植物育種に利用される組織培養には、芽培養、花粉培養、未熟胚培養、種子胚培養、幼葉培養、根端培養、胚軸培養等がある。その方法は芽、花粉、未熟胚、種子胚、幼葉、根端、胚軸等の組織からカルス(ここでいうカルスとは、カルス、不定胚、胚様体等組織培養によって生産される培養体の総称の意味である。)を形成させ、得られたカルスからの植物体再分化により植物体を得る方法である。その結果、遺伝子の固定や変異を獲得することができる。

薬培養、花粉培養では花粉由来の半数体の植物体を得ることができ、得られた半数体の植物体を二倍化させることにより、遺伝子を早期に固定することができる。その結果新しい品種を効率的に育成することができ、イネ科植物、特にイネ、ムギ類では薬培養、花粉培養が新しい品種の育成に利用されている。

組織培養を植物育種に利用するとき重要なものは再分化植物体を多数得ることであり、そのためには、植物組織からの高いカルス形成率とカルスからの高い植物体再分化率を得ることが重要である。

この点について、アミノ酸類やビタミン類等の添加物を、植物組織からカルスを形成させる培地即ちカルス形成培地や、カルスから植物体を再分化させる培地即ち植物体再分化培地に添加する等の工夫がなされてきたが、必ずしも実用的に充分な方法とはいえない。

また、植物ホルモンを用いる植物組織培養方法としては、例えば2, 4-ジクロロフェノキ

シ酢酸とナフタレン酢酸とを含む同一培地で、植物組織からのカルス形成とカルスからの植物体再分化とをさせる方法により、組織培養にかかる労力を削減できることが報告されている（中村ら、北陵作物学会報、第20巻、第1～4頁1985年）。

<発明が解決しようとする課題>

しかしながら、従来知られている方法では、十分に高いカルス形成率と高い植物体再分化率を得ることはできない。

<課題を解決するための手段>

本発明者らは、植物組織からの高いカルス形成率とカルスからの高い植物体再分化率を得る方法について鋭意検討した結果、植物の組織培養において、植物組織を組織培養用培地に植え付ける前に、該植物組織を天然または合成オーキシニンを含む水溶液（さらに、天然または合成サイトカイニンをも含んでいてもよい）で処理することにより、植物組織からの高いカルス形成率とカルスからの高い植物体再分化率とを得

ることができることを見出し、本発明に至った。

以下、本発明を詳細に説明する。

植物組織、例えば薬、花粉、未熟胚、種子胚、幼葉、根端、胚軸等を例えばエタノール、次亜塩素酸ソーダ等で滅菌した後、滅菌した植物組織を天然または合成オーキシニンを含み、さらに天然または合成サイトカイニンをも含んでいてもよい水溶液で処理する。即ち、植物組織を天然または合成オーキシニンを含み、さらに天然または合成サイトカイニンをも含んでいてもよい上記水溶液に浸漬し静置する、浸漬し攪拌する、浸漬し減圧後静置または攪拌する等の処理をする。

その後、植物組織を植物組織培養用培地に植え付ける。該培地としては、例えばN6培地（Sci. Sin. 第18巻、659頁、668頁、1975年）、MS培地（Physiol. Plant. 第15巻、473頁、497頁、1962年）、ポテト培地（Acta Gen. Sin. 第3巻、25頁、31頁、1976年）、ポテトII培地（Haploids of Higher Plants in Vitro 26頁、41頁、スプ

リンガー発行、1986年）等が用いられる。植え付け後2週間から6週間で高率でカルスが形成される。

本発明方法においては、さらに、得られたカルスから植物体を再分化させるのに新しい培地に植え付けをせずに、同一の培地で植物体の再分化を行うことができ、労力の減少をはかることもできる。

上記のようにして、通常植物組織植え付け後30～65日で再分化植物体を得ることができる。

本発明において用いられる天然または合成オーキシニンの具体例としては、天然オーキシニンであるインドール酢酸（以下、IAAと記す。）、合成オーキシニンである2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸（以下、2, 4-Dと記す。）、ピクロラム、ダイカンバ、インドール酪酸（以下、IBAと記す。）、ナフタレン酢酸（以下、NAAと記す。）、ナフタレンアセトアミド、5-クロロ-1H-インダゾール-3-イル酢酸

エチル、MCPA、2, 4, 5-T、2, 3, 6-TB、ジクロロプロップ、メコプロップ、2, 4-DB、MCPB、フェノプロップが挙げられ、インドール酢酸、インドール酪酸、ナフトレン酢酸の使用が好ましい。

また、天然または合成サイトカイニンの具体例としては、天然サイトカイニンであるゼアチン、トランスーリボシルゼアチン、合成サイトカイニンであるカイネチン、ベンジルアデニン（以下、BAと記す。）、チジアジュロン、4-ピリジルフェニルウレア、CPPU、2-イソペンテニルアデニン、2-イソペンテニルアデノシンが挙げられ、ゼアチン、カイネチン、ベンジルアデニンの使用が好ましい。

植物組織の前処理に用いられる水溶液には、少なくとも一種類以上の天然または合成オーキシシンが含まれていることが必要であり、さらに一種類以上の天然または合成サイトカイニンを併用することにより、植物体の再分化率が高まることがある。

#### 試験例1～8

イネ (*Oryza sativa* L.) 品種「黄金晴」および「コシヒカリ」を用いて、次に示すような方法にて薬培養を行った。

圃場にて「黄金晴」および「コシヒカリ」を栽培し、1穂期中ないし後期の花粉を含む幼穂をサンプリングした。サンプリングした幼穂をガーゼ、アルミホイルで包み、5℃で7日間低温処理した後、薬を無菌的に取り出し、種々のオーキシシン等を含む水溶液に24時間浸漬した。

その後、植物ホルモンを含まないN6培地に薬を植え付けた。形成されたカルス数の調査は、薬植え付け後40日に行った。形成されたカルスはその培地でさらに培養を続け、再分化植物体数の調査を薬植え付け後60日に行った。

また、比較例1および2は上述と同様にして薬を無菌的に取り出し、オーキシシン等を含む水溶液に浸漬せず、2.0 mg/lの2, 4-D

用いられる天然または合成オーキシシンの濃度は通常0.1～100 mg/l、好ましくは0.5～50 mg/lである。天然または合成オーキシシンと天然または合成サイトカイニンとを併用する場合、通常各々を0.1～100 mg/l、好ましくは0.5～50 mg/lの濃度で用いる。

植物組織の前処理においては、通常上記の水溶液に1時間～3日間、好ましくは6時間～2日間浸漬することにより行われる。

尚、この前処理に用いられる水溶液中には、さらにジベレリン類、アブシジン酸、ブラシノリド類、エチレン等を含んでいてもよい。

#### <実施例>

以下、試験例にて本発明をより詳細に説明するが、もちろん本発明は以下の例のみに限定されるものではない。

尚、以下の試験例において、カルス形成率は植え付けた薬当たりの形成されたカルス数を表わし、植物体再分化率は植え付けた薬当たりの再分化植物体数を表わす。

と0.5 mg/lのBAとを含むN6培地に薬を植え付け、50日後に形成されたカルス数を調査した。形成されたカルスをさらに5.0 mg/lのBAと0.1 mg/lのNAAとを含むN6培地に植え付け、さらに60日後に再分化植物体数の調査を行った。

黄金晴を用いた試験結果を第1表に示す。

また、コシヒカリを用いた試験結果を第2表に示す。

第1表

試験例	前処理した水溶液の組成	カルス形成率(%)	植物体再分化率(%)
1	NAA 10mg/l	24.71	2.29
2	NAA 10mg/l BA 1.0mg/l	32.12	11.21
3	NAA 10mg/l BA 5.0mg/l	33.24	4.66
4	NAA 10mg/l BA 25mg/l	31.25	4.06
比較例 1		13.26	1.15

第2表

試験例	前処理した水溶液の組成	カルス形成率(%)	植物体再分化率(%)
5	IBA 15mg/l	13.68	1.99
6	IAA 10mg/l IBA 5.0mg/l	9.95	3.14
7	IAA 10mg/l ゼチン 10mg/l	15.16	5.59
8	IAA 10mg/l ゼチン 20mg/l	14.46	2.69
比較例 2		9.94	0.99

## 試験例9~13

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品種「チャイニーズスプリング」を用いて、次に示すような方法にて薬培養を行った。

温室にて「チャイニーズスプリング」を栽培し、1株期中ないし後期の花粉を含む幼穂をサンプリングした。サンプリングした幼穂をガーゼ、アルミホイルで包み、5℃で7日間低温処理した後、薬を無菌的に取り出し、種々のオーキシン等を含む水溶液に12時間

浸漬した。

その後、植物ホルモンを含まないポテトII培地に薬を植え付けた。形成されたカルス数の調査は、薬植え付け後40日に行った。形成されたカルスはその培地でさらに培養を続け、再分化植物体数の調査を、薬植え付け後65日に行った。

また、比較例3は上述と同様にして薬を無菌的に取り出し、オーキシン等を含む水溶液に浸漬せず、1.5mg/lの2, 4-Dと0.5mg/lのカイネチンとを含むポテトII培地に薬を植え付け、50日後に形成されたカルス数を調査した。形成されたカルスをさらに0.5mg/lのカイネチンと0.5mg/lのNAAとを含むN6培地に植え付け、さらに62日後に再分化植物体数の調査を行った。

結果を第3表に示す。

第3表

試験例	前処理した水溶液の組成	カルス形成率(%)	植物体再分化率(%)
9	NAA 10mg/l	6.85	1.25
10	IAA 10mg/l IBA 5.0mg/l	6.64	0.91
11	IAA 50mg/l	5.41	1.01
12	NAA 10mg/l ゼチン 5.0mg/l	7.08	2.54
13	NAA 10mg/l ゼチン 20mg/l	5.86	1.96
比較例 3		3.76	0.56

## 試験例14~17

トマト (*Lycopersicon esculentum* MILL L.) 品種「ポンテローザ」を用いて、次に示すような方法にて胚軸の培養を行った。

「ポンテローザ」種子を滅菌後、寒天上で無菌的に発芽させた。発芽後約7日の胚軸を切取り、種々のオーキシン等を含む水溶液に30時間浸漬した。

その後、カイネチンを含むMS培地に胚軸

を植え付けた。形成されたカルス数の調査は胚軸植え付け後30日に行った。形成されたカルスはその培地でさらに培養を続け、再分化植物体数の調査を、薬植え付け後55日に行った。

また、比較例4は上述と同様にして得た胚軸を、オーキシン等を含む水溶液に浸漬せず1.0mg/lのIAAと1.0mg/lのBAとを含むMS培地に植え付け、42日後に形成されたカルス数を調査した。形成されたカルスをさらに2.0mg/lのBAを含むMS培地に植え付け、さらに52日後に再分化植物体数の調査を行った。

結果を第4表に示す。

第4表

試験例	前処理した水溶液の組成	カルス形成率(%)	植物体再分化率(%)
14	NAA 10mg/l BA 2.0mg/l	90.3	38.7
15	NAA 2.0mg/l BA 1.0mg/l	69.2	23.1
16	IBA 5.0mg/l	63.6	18.2
17	IAA 5.0mg/l	43.2	24.3
比較例 4		39.3	10.7

## &lt;発明の効果&gt;

本発明の植物の組織培養方法を用いることにより、植物組織からの高いカルス形成率とカルスからの高い植物体再分化率を得ることができる。